

十足目甲壳动物精子冷冻保存*

管卫兵 王桂忠 李少菁
(厦门大学海洋学系, 361005)

杂交育种、种质优选、雌核发育及物种保护等研究都要涉及到精液冷冻保存。精液的长期保存,可以保证基因长时间的稳定性,能以较少的时间和空间保证精子的供应,没有季节限制,也不需较高的饲养亲本的花费,大大提高了选择育种的可行性。和其他水生生物大量精子冷冻研究相比(Mistutoshi, 2000),甲壳动物精子冷冻保存研究很少,主要集中在十足目甲壳动物。虽然十足目甲壳动物最近在养殖上越来越重要,但其精子冷冻保存技术依然很少(Chow, 1985; Anchordoguy 等, 1988; Jeyaleetumie 和 Subramoniam, 1989; Dumont 等, 1992; Subramoniam, 1994; 柯亚夫等, 1996; Bhavanishankar 和 Subramoniam, 1997)。

要保存精子,必须有相应的评价冷冻复苏精子活力的方法,当前还没有一个简单、准确的评价冷冻复苏精子活力和受精能力的方法,观察精子运动性仍然是实验室评价无脊椎动物精子活力的可行方法。精子活力评价的困难,是十足目甲壳动物精子冷冻保存研究成功缺乏的主要原因(Anchordoguy 等, 1988; Subramoniam, 1994; Wang 等, 1995)。

十足目甲壳动物精子没有鞭毛,不能运动(Clark 等, 1981; Griffin 和 Clark, 1990; Hinsch, 1991)。虽然精子形态非常多样,但都有一个典型的顶体结构。顶体位于精子头前部,邻近质膜,是一种膜性泡状结构。顶体含有酶类,受精时起到外吐和穿透卵子作用,精子只有发生顶体反应才能和卵膜相结合,并穿透卵外膜(Clark, 1981)。当精子穿过前输精管时,精子基团增加了其它物质。在蟹类,精子团由中段和后段输精管分泌的精液所包围,交配时精子团转移到雌性纳精囊,精子在雌体中贮存一段时间才会产卵。在虾类,精子团包于精英,交配时转移到雌体腹部,这些精英可能被内部吸收,或粘附于腹部直到产卵(Hinsch, 1991)。在交配后的雌蟹和纳精囊为封闭

式的中国对虾(*Penaeus monodon*)(Hinsch, 1991; Lin 和 Ting, 1986)的纳精囊腔中都可观察到游离的精子。精子和卵水接触,可以被激活诱导产生顶体反应。对于真正的短尾类,锯缘青蟹(*Scylla serrata*),其受精发生在纳精囊内部,使用贮存的精子(Subramoniam, 1994),因此很难获得未受精的卵子用于实验。至今没有有关蟹类具有封闭式纳精囊对虾精子在雌体贮存中有着获能需要的报道。虽然受精是评价动物冷冻复苏精子质量的最终标准,但对于十足目甲壳动物现阶段并不现实,主要是因为很难获得十足目未受精的、成熟度一致的卵。许多研究者正在试图建立和完善一个可信的评价十足目甲壳动物精子质量的方法,包括:生物染色、低渗外吐实验、精卵相互作用、生化分析及精子顶体反应的诱导(Anchordoguy 等, 1988; Wang 等, 1995; Bhavanishankar 和 Subramoniam, 1997)。

精子冷冻主要有两种系统,一为液态,主要优点是可以低数目的精子维持一定的受精率,实际应用时要注意减少精子内部的磷酸化或加入自由基清除剂以减少还原性氧的产生;另一种类型是固态,可进行精子长期保存,这主要归功于甘油成功的应用于精子的冷冻保存(Mistutoshi, 2000)。pH 波动、冷休克、冰晶的形成、渗透压作用、冷冻剂的毒性是冷冻损伤的主要因素(Chao 和 Liao, 2001)。贮存温度、冷冻速率、稀释液的化学成份、冷冻剂浓度及卫生条件是影响冷冻保存精子存活的关键因子(Mistutoshi, 2000),甲壳动物精子的冷冻保存研究主要围绕这几个方面展开。

1 精子的处理

十足目甲壳动物成熟的精子一般从输精管、体外的精英或纳精囊中获得,采用机械研磨和酶消化两种方法。Chow 等(1985)直接从交配后的罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)胸板获取精英用于受

* 福建省自然科学基金资助项目(C9810006),福建省“海洋生物优良种质和生物活性物质的应用基础研究”项目资助

收稿日期: 2002-03-17

精研究。Anchordoguy 等(1988)采用组织研磨器研磨锐脊单肢虾(*Sicyona ingentis*)输精管或纳精囊,释放精子或精子团,然后离心分离出精子。Bhavanishankar 和 Subramoniam(1997)和王艺磊等(2001)采用1% (w/v) 蛋白酶消化及机械方法,释放锯缘青蟹精英中的精子,用于冷冻保存。从纳精囊中获得的精子的完整性高于酶消化和机械法,酶处理的精子状态波动较大,且对精子有刺激作用,易于诱导精子顶体反应。另外酶处理精英释放的精子,冷冻时更易受损。因此一般采用纳精囊中游离精子或对进行机械研磨精英获得精子用于冷冻实验。

2 稀释液和冷冻剂

稀释的天然或人工海水已被广泛地用于十足目甲壳动物精子冷冻的研究中(Bray 和 Lawrence, 1998; Anchordoguy 等, 1988; Dumont 等, 1992; Bhavarrishankar 和 Subramoniam, 1997; 柯亚夫等, 1996)。Bray 和 Lawrence(1998)发现海水和无钙离子的人工海水都可以作为缓冲介质。中国对虾稀释液中则不能缺少钙、镁、钾离子中任何一种, Ca^{2+} 浓度不能超过 0.7mol/L (柯亚夫等, 1996)。

不同甲壳动物的冷冻保护剂是不一样的,二甲亚砜(DMSO)和甘油是最常用的两种。Anchordoguy 等(1988)研究了不同冷冻剂对锐脊单肢虾精子的冷冻效果,发现DMSO是一种比甘油、果糖、脯氨酸、海藻糖更有效的冷冻剂,5%的DMSO的结果最好,高浓度结果不稳定。在添加冷冻剂时的温度不同显著影响锯缘青蟹精子的存活率,降低添加冷冻剂时的温度可以减少冷冻剂对精子损伤作用,高DMSO浓度时效果更明显(Bhavanishankar 和 Subramoniam, 1997)。10%的甘油成功地用于罗氏沼虾精英冷冻保存(Chow 等, 1985)。柯亚夫等(1996)用含有10% DMSO和5%~10%甘油的稀释液冷冻中国对虾精子,成活率可达60%。Bhavanishankar 和 Subramoniam(1997)发现甘油中冷冻的青蟹精子比在DMSO中冷冻的有更高的成活率,青蟹精子对甘油比DMSO和乙烯甘油(EG)有更高的忍受能力,在 12.5% 甘油, 0.5°Cmin^{-1} 的冷冻率条件下精子的成活率最高。Jeyalectumie 等(1989)认为甘油成功用于蟹类的精子冷冻,可能是由于甘油也是蟹类脂肪代谢的中间产物。虽然采用乙烯甘油可以成功地保存青蟹精子,但结果并不稳定(Bhavanishankar 和 Subramoniam, 1997)。在三个不同的温度下(15°C 、 20°C 和 23°C),甲醇对青蟹精子的毒性小于DMSO、EG及甘油(Bhavanishankar 和 Subramoniam, 1997)。

冷冻剂的联合使用可以产生好的结果。单独使用海藻糖时,对青蟹的精子有低的保护作用,但和DMSO联合使用时,精子存活率大大提高(Jeyalectumie 和 Subramoniam, 1989)。相应的结果在锐脊单肢虾精子冷冻中也发现,但5% DMSO和其他冷冻剂联合使用却不能提高其精子的成活率(Anchordoguy 等, 1988)。柯亚夫等(1996)单独用甘油或DMSO冷冻中国对虾精子时效果不佳。

3 冷冻和复苏

液氮常被用于甲壳动物精子冷冻保存(Chow 等, 1985; Jeyalectumie 和 Subramoniam, 1989; Bhavanishankar 和 Subramoniam, 1997; 柯亚夫等, 1996)。青蟹精子和精英不同,不能忍受快速的冷冻率,例如直接投入液氮,同时采用比较慢的(5°Cmin^{-1})而不是快的(7°Cmin^{-1})冷冻速率,有更好的冷冻效果(Bhavanishankar 和 Subramoniam, 1997)。Anchordoguy 等(1988)认为冷冻速率对于冷冻复苏虾的精子存活起很重要的作用,以快于 5°Cmin^{-1} 或慢于 5°Cmin^{-1} 冷冻锐脊单肢虾的精子,发现 1°Cmin^{-1} 有最高的存活率(Anchordoguy 等, 1988)。Dumont 等(1992)发现以 1.6°Cmin^{-1} 速度冷冻南美白对虾(*Penaeus vannamei*)精子时比 0.3°Cmin^{-1} 和 1.8°Cmin^{-1} 有更好的效果。

精子冷冻时平衡时间也很重要,Chow 等(1985)在自来水和10%甘油的混合物中平衡罗氏沼虾精英15~30分钟,得到最佳的效果。两步冷冻法已被成功地用于甲壳动物精子的冷冻。Chow 等(1985)将罗氏沼虾的精英转移到1ml的玻璃试管,在准备长期贮存到液氮中之前,在液氮中预冷了5~10分钟。Anchordoguy 等(1988)证明锐脊单肢虾冷冻到 -30°C 再浸入液氮中的精子的存活率很稳定,但如果预冷不到 -30°C 则成活率不够理想。Bhavanishankar 和 Subramoniam(1997)发现青蟹精子在 -30°C 和 -50°C 浸入液氮中的存活率没有差异。中国对虾精子在 $0\sim 4\text{°C}$ 平衡20~30min很有必要,也不会发生顶体反应(柯亚夫等, 1996)。

冷冻精液一般在 $15\sim 30\text{°C}$ 水浴中复苏,复苏速率越快,精子存活率越高。青蟹精子的冷冻复苏是将0.5ml的试样浸入 55°C 水浴中10~15秒。但锐脊单肢虾精子在 0°C 、 22°C 和 37°C 的水浴中复苏的存活率没有差异(Anchordoguy 等, 1988)。和其不一样,青蟹精子不能忍受 1°Cmin^{-1} 的复苏程序(Bhavanishankar 和 Subramoniam, 1997)。中国对虾的精子解冻,在 $20\sim 40\text{°C}$ 较好,而以 $35\sim 40\text{°C}$ 最佳(柯亚夫等, 1996)。

4 建议

4.1 冷冻程序标准化

冷冻时精子的密度和受精测试时精卵的比例,对于精液冷冻评价非常重要。冷冻保存后大部分精子有受伤的顶体和质膜,受精能力远远低于新鲜精子,往往要提高复苏的精子密度,才能弥补其中活动精子量的减少,以达到正常的受精效果。目前大部分研究仅强调了冷冻时精液稀释比例,精子密度并没有明确。柯亚夫等(1996)认为采用不同体积的样品进行超低温保存时,需用不同降温方法。如果精子稀释液、抗冻剂组成及降温速率一定,随着体积的增大,解冻后精子存活率会降低。精子的浓度过大也不利于超低温保存,冷冻后的存活率波动也很大。因此为了更好、更准确的评价各种冷冻程序,冷冻时精子的密度、精卵相互作用时的精子数目应该标准化。冷冻和复苏速率对精子冷冻保存成功与否很重要,在液氮中的精子最佳的冷冻速率随着冷冻装置,样品尺寸及样品在冷冻室中的位置不同而不同。对于十足目甲壳动物精子冷冻和复苏的速率研究还很少,有待进一步研究。

4.2 重视精英和精液的生化成分在精子冷冻保存中的作用

十足目甲壳动物有一个独特的精英结构。Ishida等(1996)和Ting等(1990)已成功地将冷冻巨螯虾属(*Homarus*)和长毛对虾(*P. penicillatus*)精英用于人工受精。龙虾精子可以贮存289天,且形态正常,能够发生顶体反应,但采用贮存过程中精子有退化,且精子团中有细菌生长(Ishida等,1986)。Jeyalectumie和Subramoniam(1989)成功地贮存了青蟹的精英,发现在-79℃和-196℃贮存30天的精英中精子能够保持活力。甲壳动物精对精子的保护和营养作用还不太清楚,有人认为精英的酸性粘多糖有助于防止脱水和细菌作用(Sasikala和Subramoniam,1987)。但可以明确的是,精英在十足目甲壳动物精子转移和贮存中起重要作用(Sasikala和Subramoniam,1987;Subramoniam,1993;Hinsch,1991)。精英不但为精子的转移提供保护作用,而且为精子长期贮存提供能源物质,十足目甲壳动物精子在精英中具有长期存活的能力,它们可以在输精管和纳精囊中保存几年之久,直到产卵和受精(Hinsch,1991)。需要进一步对精英和精液的化学成份进行研究,以确定其在精子保护和长期贮存中的作用。这对于确定精子在纳精囊或粘于雌体腹部时保持活力的机制,对于提高甲壳动物精子的冷冻的成功都是非常具有参考价值的。

要成功进行甲壳动物精子的长期冷冻保存,除选用合适的抗冻剂外,还要考虑适宜的渗透压、酸碱度、精子的无机和有机物质营养需求及抗菌物质。为此要加强对十足目甲壳动物精英形成机制和纳精囊中各种理化条件的研究(Jeyalectumie和Subramoniam,1991),以形成一个完善的十足目甲壳动物精子冷冻稀释液,这是成功进行其精子长期保存的基础。

4.3 注意甲壳动物精子活力评价方法的选择

因为成熟的十足目甲壳动物精子不能运动,运动能力不适用于其精子的评价。精子数目和形态评价已用于评价对虾的繁殖能力(Wang等,1995),除此之外,评价甲壳动物精子活力和受精能力测试方法有:台盼蓝色素外吐(Wang等,1995;Bhavanishankar和Subramoniam,1997;柯亚夫,1996),曙红和苯胺黑染色反应(Bhavanishankar和Subramoniam,1997;柯亚夫,1996),低渗外吐(Bhavanishankar和Subramoniam,1997),生化分析(Bhavanishankar和Subramoniam,1997;冯北元,1995),诱导精子顶体反应(Anchoroguy等,1988),受精测试(陈立侨等,1996;陈本楠等,1997)。其中较为成熟的是色素外吐法和诱导顶体反应。但都有其局限性。Bhavanishankar和Subramoniam(1997)证实色素外吐技术不能用于评价青蟹精子的存活,因为精英和精子膜通透性不同及不同染液的选择性通透性存在差异。Wang等(1995)也认为生物染色和形态评价对精子的理化状况提供的信息有限,生物染色技术有时可能过高的估计了活精子的比例。卵水和A23187都已用于甲壳动物精子顶体反应的诱导(Clark和Griffin,1993;Wang等,1995;Anchoroguy等,1988)。但Wang等(1995)发现卵水诱导的顶体反应结果不稳定,需要进一步对精子顶体反应和受精成功率之间的相关性进行研究,以改进精子质量评价。因此可以借鉴哺乳动物中有关评价精子死活的非运动性指标,如评价精子运动能力、能量地位、质膜和亚细胞物质、染色质结构的稳定和染色体损坏程度的敏感方法(Mitsutoshi,2000),用于甲壳动物精子冷冻保存的精子活力评价,最终解决十足目甲壳动物精子冷冻保存研究中的一个难题,为其遗传育种、种质保存提供参考。

参 考 文 献

- [1] Mitsutoshi, Y. Conservation of sperms: current status and new trends. *Animal Reproduction Science*. 2000, 60~ 61. 349~ 355
- [2] Chow, S., Y. Taki., Y. Ogasawara. Cryopreservation of spermatophore of

- the freshwater shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. Biol. Bull, 1985, 158. 471~ 475
- [3] Anchordoguy, T. J. , J. H. Crogwe, F. J. Griffin et al. Cryopreservation of sperm from the marine shrimp *Sicyonia ingentis*. Cryobiology, 1988, 25. 238~ 243
- [4] Jeyalectumie, C. , T. Subramoniam. Cryopreservation of spermatophores and seminal plasma of the edible crab *Scylla serrata*. Biol. Bull, 1989, 177.347~ 253
- [5] Dumont, P, Levy P, Simon C, et al. Freezing of sperm ball of the marine shrimp *Penaeus vannamei*. 1992, Abstract from the workshop on gamete and embryo storage and cryopreservation of Aquatic organisms. Marry Le Rol, France
- [6] Subramoniam, T. Cryopreservation of crustacean gametes and embryos. Pro Ind Natl Sci Acad B, 1994, 60. 229~ 236
- [7] 柯亚夫, 蔡难儿. 中国对虾精子超低温保存的研究. 海洋与湖沼, 1996, 27(2). 187~ 193
- [8] Bhavanishankar, S. , T. Subramoniam. Cryopreservation of spermatozoa of the edible mud crab *Scylla serrata* (Forskal). J. Exp. Zool, 1997, 277. 326 ~ 336
- [9] Wang, Q. Y. , M. Misamore, C. Q. Jiang et al. Egg water induced reaction and biostain assay of sperm from marine shrimp *Penaeus vannamei*: dietary effects on sperm quality, J. World Aquacult. Soc, 1995, 26. 261~ 271
- [10] Clark, W. H. Jr. , M. G. Kleeve, A. I. Yudin. An acrosome reaction in natantian sperm. J. Exp. Zool, 1981, 218. 279~ 291
- [11] Griffin, F. J. , W. H. Jr. Clark. Induction of acrosomal filament formation in the sperm of *Sicyonia ingentis*. J. Exp. Zool, 1990, 25. 296~ 304
- [12] Hirsch, G. W. Structure and chemical content of the spermatophores and seminal fluid of reptantian decapods. In: Bauer. R T & Martin J. W. et. Crustacean sexual biology, New York: Columbia University Press, 1991. 290~ 307
- [13] Lin, M. N. , Y. Y. Ting. Spermatophore transplantation and artificial fertilization in grass shrimp. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish, 1986, 52. 585~ 589
- [14] Chao, N. H. , I. C. Liao. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos, Aquaculture, 2001, 197. 161~ 189
- [15] 王艺磊, 张子平, 谢芳靖等. 锯缘青蟹精子顶体反应的研究. 动物学报, 2001, 147(3). 310~ 316
- [16] Bray, W. A. , A. L. Lawrence. Male viability deteminations in *Penaeus vannamei*: evaluation of short- term storage of spermatophores up to 36h and comparison of Ca²⁺ - free saline and seawater as sperm homogenate media. Aquaculture, 1998, 160(1- 2) . 63~ 67
- [17] Ishida, T. , P. Talbot, M. Kooda- Cisco. Technique for the long- term storage of lobster (Homarus) spermatophores, Gamete Res, 1986, 14. 183~ 195
- [18] Ting, Y. Y. , M. N. Lin, B. S/Tzeng et al. Studies on the cryopreservation of spermatophore and vas deferens of red- tail shrimp, *Penaeus penialatus*, Bull Taiwan Fish Res Inst, 1990, 49. 189~ 195
- [19] Sasikala, S. L. , T. Subramoniam. On the occurrence of acid mucopolysaccharides in the spermatophores of two marine prawns *Penaeus indicus* (Miline Edwards) and *Metapenaeus monoceros* (Fabricius) (Crustacea: Macrura) . J. Exp. Mar. Bio. Ecol, 1987, 113. 145~ 153
- [20] Subramonian, T. Sphematophores and Sperm Transfer in Marine Crustacean, Advances in marine biology. Academic Press Limited, 1993, 29. 129~ 215
- [21] Jeyalectumie, C. , T. Subramoniam. Biochemistry of seminal secretions of the crab *Scylla serrata* with reference of sperm metabolism and storage in the female. Mol Reprod Dev, 1991, 30. 44~ 55
- [22] 冯北元, 徐幕禹, 朱谨钊. 中国对虾 (*Penaeus chinenses*) 精子 ATP 酶活力与生殖关系的探讨. 海洋科学, 1995, 2. 33~ 36
- [23] 陈立桥, 王玉凤, 赵云龙等. 中国绒螯蟹人工授精和体外培养的实验研究. 淡水渔业(增刊), 1996, 26 143~ 147
- [24] 陈本楠, 蔡难儿, 李光友. 中国对虾人工诱导雌核发育的研究 II . 紫外线幅射对精子顶体反应和人工受精能力的影响. 海洋科学, 1997, 28(1). 41~ 47
- [25] Clark, W. H. Jr. , F. J. Griffin Acquisition and manipulation of penaeoidean gametes. In: Mc Vey. J. P. et. CRC Hand Book of Mariculture. Vol, 2nd. London: CRC Press, 1993. 133~ 151

深水捕鱼不下水, 30 分钟捕鱼 500~ 2000 公斤

封闭式捕鱼网箱

可捕中底层鱼类, 也可捕上层鱼类, 不受水深、杂草、珍珠养殖区、底形差所限制, 捕鱼率达 98%, 可捕大留小, 商品鱼均衡上市。

临安市渔网研究实验场

地 址: 浙江省临安市於潜镇潜阳路 209 号

电 话: 0571- 63883198 邮编: 311311

联系人: 蔡惠荣 手机: 013706710609